



①⑨ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

①⑫ **Offenlegungsschrift**  
①⑩ **DE 101 35 051 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 P 13/04**  
C 12 P 13/08

②① Aktenzeichen: 101 35 051.1  
②② Anmeldetag: 18. 7. 2001  
④③ Offenlegungstag: 6. 2. 2003

**DE 101 35 051 A 1**

⑦① Anmelder:  
Degussa AG, 40474 Düsseldorf, DE

⑦② Erfinder:  
Hermann, Thomas, Dr., 33739 Bielefeld, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑤④ Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, indem man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet,  
b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und  
c) Isolierung der L-Aminosäure.

**DE 101 35 051 A 1**

## Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen mindestens eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspK, gltA, sdhB, aceB und aceK, abgeschwächt wird (werden).

## Stand der Technik

[0002] L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

[0003] Es ist bekannt L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli (E. coli) und Serratia marcescens, herzustellen. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z. B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z. B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z. B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

[0004] Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z. B. das Threonin-Analogon  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z. B. L-Threonin produzieren.

[0005] Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht.

## Aufgabe der Erfindung

[0006] Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

## Beschreibung der Erfindung

[0007] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren, und in denen mindestens eine oder mehrere der für die Gene malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, kodierende(n) Nukleotidsequenz(en) abge-

schwächt wird (werden).

[0008] Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

[0009] Der Begriff "Abschwächung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym (Protein) oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0010] Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

[0011] Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen mindestens eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, abgeschwächt wird (werden),
- b) Anreicherung der entsprechenden L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, und
- c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (> 0 bis 100%) davon im Produkt verbleiben.

[0012] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

[0013] Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise Escherichia coli TF427  
Escherichia coli H4578  
Escherichia coli KY10935  
Escherichia coli VNIIGenetika MG442  
Escherichia coli VNIIGenetika M1  
Escherichia coli VNIIGenetika 472T23  
Escherichia coli BKIIM B-3996

*Escherichia coli* kat 13

*Escherichia coli* KCCM-10132.

[0014] Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung *Serratia*, insbesondere der Art *Serratia marcescens* sind beispielsweise

*Serratia marcescens* HNr21

*Serratia marcescens* T1Lr156

*Serratia marcescens* T2000.

[0015] L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz gegen Ethionin, Resistenz gegen  $\alpha$ -Methylserin, Resistenz gegen Diaminobornsteinsäure, Resistenz gegen  $\alpha$ -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfK-Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und Abschwächung der Essigsäurebildung.

[0016] Es wurde gefunden, daß Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Abschwächung, insbesondere Ausschaltung mindestens eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, cda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpI, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, in verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

[0017] Die Nukleotidsequenzen der Gene von *Escherichia coli* gehören zum Stand der Technik und können ebenfalls der von Blattner et al. (Science 277, 1453-1462 (1997)) publizierten Genomsequenz von *Escherichia coli* entnommen werden.

malE-Gen:

Bezeichnung: Periplasmatisches Maltose-Bindeprotein

Referenz: Duplay et al., Journal of Biological Chemistry 259(16): 10606-13 (1984)

Accession No.: AE000476

Alternativer Genname: malB

phoA-Gen:

Bezeichnung: Alkalische Phosphatase

EC-Nr.: 3.1.3.1

Referenz: Berg; Journal of Bacteriology 146(2), 660-7 (1981)

Accession No.: AE000145

phoB-Gen:

5 Bezeichnung: Positiver Regulator des pho Regulons, Zwei-Komponenten System

Referenz: Makino et al.; Journal of Molecular Biology 190 (1), 37-44 (1986)

Accession No.: AE000146

10 Alternative Gennamen: phoRc, phoT

phoR-Gen:

Bezeichnung: Positives und negatives Sensorprotein des pho Regulons, Sensor des Zwei-Komponenten Systems  
EC-Nr.: 2.7.3.-

15 Referenz: Makino et al.; Journal of Molecular Biology 192(3), 549-56 (1986)

Accession No.: AE000146

Alternative Gennamen: R1pho, nmpB, phoR1

phoE-Gen:

20 Bezeichnung: Protein der äusseren Zellmembran E (E, Ic, NmpAB)

Referenz: Overbecke et al.; Journal of Molecular Biology 163(4), 513-32 (1983)

Accession No.: AE000132

25 Alternativer Genname: ompE

phnC-Gen:

Bezeichnung: ATP-Bindedomäne des Phosphonat Transporters

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

phnD-Gen:

Bezeichnung: Periplasmatisches Bindeprotein des Phosphonat Transporters

35 Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

Alternativer Genname: psiD

phnE-Gen:

40 Bezeichnung: Integrale Membrankomponente des Phosphonat Transporters

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

45 phnF-Gen:

Bezeichnung: Putativer Regulator des Phosphonat Transporters

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

50 Accession No.: AE000482

phnG-Gen:

Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-einheit (Phosphonat Metabolismus)

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

phnJ-Gen:

Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-einheit (Phosphonat Metabolismus)

60 Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

phnK-Gen:

Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-einheit (Phosphonat Metabolismus)

65 Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173 (8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

- phnL-Gen:  
Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-  
einheit (Phosphonat Metabolismus)  
Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8),  
2665-12 (1991)  
Accession No.: AE000482
- phnM-Gen:  
Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-  
einheit (Phosphonat Metabolismus)  
Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8),  
2665-12 (1991)  
Accession No.: AE000482
- phnN-Gen:  
Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-  
einheit (Phosphonat Metabolismus)  
Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8),  
2665-12 (1991)  
Accession No.: AE000482
- phnO-Gen:  
Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-  
einheit (Phosphonat Metabolismus)  
Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8),  
2665-12 (1991)  
Accession No.: AE000482
- phnP-Gen:  
Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-  
einheit (Phosphonat Metabolismus)  
Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8),  
2665-12 (1991)  
Accession No.: AE000482
- pykF-Gen:  
Bezeichnung: Pyruvat Kinase I (ehemals F), Fructose stimu-  
liert  
EC-Nr.: 2.7.1.40  
Referenz: Ponce et al.; Journal of Bacteriology 177(19):  
5719-22 (1995)  
Accession No.: AE000262
- pfkB-Gen:  
Bezeichnung: 6-Phosphofructokinase II; Suppressor von  
pfkA  
Referenz: Daldal; Gene 28(3), 337-42 (1984)  
Accession No.: AE000267
- eda-Gen:  
Bezeichnung: 2-Keto-3-Desoxygluconat 6-Phosphat Aldo-  
lase und 2-Keto-4-Hydroxyglutarat Aldolase (Entner-Dou-  
doroff Aldolase)  
EC-Nr.: 4.1.2.14 4.1.3.16  
Referenz: Carter et al.; Gene 130(1), 155-6 (1993)  
Accession No.: AE000279  
Alternative Gennamen: kga, kdgA
- talB-Gen:  
Bezeichnung: Transaldolase B  
EC-Nr.: 2.2.1.2  
Referenz: Sprenger et al.; Journal of Bacteriology 177(20),  
5930-6 (1995)  
Accession No.: AE000111
- rpiB-Gen:  
Bezeichnung: Ribose 5-Phosphat Isomerase B  
Referenz: Sorensen und Hove-Jensen; Journal of Bacterio-  
logy 178(4), 1003-11 (1996)  
Accession No.: AE000482
- zwf-Gen:  
Bezeichnung: Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (Zwi-  
schenferment)  
EC-Nr.: 1.1.1.49  
Referenz: Rowley und Wolf; Journal of Bacteriology  
173(3), 968-77 (1991)  
Accession No.: AE000279
- mopA-Gen:  
Bezeichnung: GroEL, Chaperon Hsp60, Peptid-abhängig  
Referenz: Chandrasekhar et al.; Journal of Biological Che-  
mistry 261(26), 12414-9 (1986)  
Accession No.: AE000487  
Alternative Gennamen: groE, groEL, hdh, tabB; 60 kD cha-  
peronin (CPN60)
- pstA-Gen:  
Bezeichnung: Hoch-affines Phosphat Transport System  
Referenz: Surin et al.; Journal of Bacteriology 161(1),  
189-98 (1985)  
Amemura et al.; Journal of Molecular Biology 184(2),  
241-50 (1985)  
Accession No.: AE000449  
Alternative Gennamen: R2pho, phoR2b, phoT
- pstB-Gen:  
Bezeichnung: ATP-Bindekomponente des hoch-affinen  
Phosphat Transport Systems  
Referenz: Surin et al.; Journal of Bacteriology 161(1),  
189-98 (1985)  
Amemura et al.; Journal of Molecular Biology 184(2),  
241-50 (1985)  
Accession No.: AE000449  
Alternativer Genname: phoT
- pstC-Gen:  
Bezeichnung: Hoch-affines Phosphat Transport System, Cy-  
toplasmamembran Komponente  
Referenz: Surin et al.; Journal of Bacteriology 161(1),  
189-98 (1985)  
Accession No.: AE000449  
Alternativer Genname: phoW
- pstS-Gen:  
Bezeichnung: Hoch-affines Phosphat Transport System; Pe-  
riplasmatisches Phosphatbindeprotein  
Referenz: Surin et al., Journal of Bacteriology 157, 772-8  
(1984);  
Magota et al., Journal of Bacteriology 157, 909-17 (1984)  
Accession No.: AE000449  
Alternative Gennamen: R2pho, nmpA, phoR2a, phoS
- ugpB-Gen:  
Bezeichnung: sn-Glycerin-3-Phosphat Transport System;  
Periplasmatisches Bindepotein  
Referenz: Overduin et al.; Molecular Microbiology 2(6),  
767-75 (1988)  
Accession No.: AE000421  
Alternative Gennamen: psiB, psiC,
- ugpA-Gen:  
Bezeichnung: sn-Glycerin-3-Phosphat Transport System,  
Integrale Membran Protein  
Referenz: Overduin et al.; Molecular Microbiology 2(6),  
767-75 (1988)  
Accession No.: AE000421  
Alternative Gennamen: psiB, psiC
- ugpE-Gen:  
Bezeichnung: sn-Glycerin-3-Phosphat Transport System,  
Integrale Membran Protein  
Referenz: Overduin et al.; Molecular Microbiology 2(6),  
767-75 (1988)  
Accession No.: AE000421
- ugpC-Gen:  
Bezeichnung: ATP-Bindekomponente des sn-Glycerin-3-  
Phosphat Transport Systems  
Referenz: Overduin et al.; Molecular Microbiology 2(6),  
767-75 (1988)  
Accession No.: AE000421
- ugpQ-Gen:  
Bezeichnung: Glycerinphosphodiester Phosphodiesterase,  
cytosolisch

EC-Nr.: 3.1.4.46  
Referenz: Kasahara et al.; Nucleic Acids Research 17 (7), 2854 (1989)  
Accession No.: AE000421  
dnaK-Gen:  
Bezeichnung: Chaperon Hsp70; DNA Biosynthese; autoreguliertes Hitzeschockprotein  
Referenz: Bardwell und Craig; Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 81(3), 848-52 (1984)  
Accession No.: AE000112  
Alternative Gennamen: gro, groP, groPAB, groPC, groPF, grpC, grpF, seg  
dnaJ-Gen:  
Bezeichnung: Chaperon; Hitzeschockprotein  
Referenz: Ohki et al.; Journal of Biological Chemistry 261(4), 1778-81 (1986)  
Accession No.: AE000112  
Alternative Gennamen: groP, grpC  
clpB-Gen:  
Bezeichnung: Hitzeschockprotein (caseinolytische Protease)  
EC-Nr.: 1.17.4.- 3.4.21.-  
Referenz: Kitagawa et al.; Journal of Bacteriology 173(14), 4247-53 (1991)  
Accession No.: AE000345  
rpoE-Gen:  
Bezeichnung: RNA Polymerase, Sigma-E Faktor; Hitzeschock und oxidativer Stress  
Referenz: Raina et al.; EMBO Journal 14(5), 1043-55 (1995)  
Accession No.: AE000343  
rseA-Gen:  
Bezeichnung: sigma-E Faktor, negativer Regulator (Membranprotein Regulator der  $\sigma^E$  Aktivität)  
Referenz: Missiakas et al.; Molecular Microbiology 24(2), 355-71 (1997)  
Accession No.: AE000343  
Alternative Gennamen: mclA  
rseC-Gen:  
Bezeichnung: sigma-E Faktor, globaler Regulator  
Referenz: Missiakas et al.; Molecular Microbiology 24(2), 355-71 (1997)  
Accession No.: AE000343  
htpG-Gen:  
Bezeichnung: Chaperon Hsp90, Hitzeschockprotein C 62.5  
Referenz: Spence und Georgopoulos; Journal of Biological Chemistry 264(8), 4398-403 (1989)  
Accession No.: AE000153  
sodA-Gen:  
Bezeichnung: Superoxiddismutase  
Referenz: Touati; Journal of Bacteriology 155 (3): 1078-87 (1983)  
Accession No.: AE000465  
ompF-Gen:  
Bezeichnung: Äusseres Membranprotein 1a (Ia; b; F)  
Referenz: Inokuchi et al.; Nucleic Acids Research 10(21), 6957-68 (1982)  
Accession No.: AE000195  
Alternative Gennamen: cmlB, coa, cry, tolF  
ompC-Gen:  
Bezeichnung: Äusseres Membranprotein 1b (Ib; c)  
Referenz: Mizuno et al.; Journal of Biological Chemistry 258(11), 6932-40 (1983)  
Accession No.: AE000310  
Alternative Gennamen: meoR, par  
sucA-Gen:  
Bezeichnung: 2-Ketoglutarat Dehydrogenase (Decarboxylase Untereinheit)

EC-Nr.: 1.2.4.2  
Referenz: Darlison et al.; European Journal of Biochemistry 141(2), 351-9 (1984)  
Accession No.: AE000175  
5 Alternative Gennamen: lys, met  
sucB-Gen:  
Bezeichnung: 2-Ketoglutarat Dehydrogenase (Dihydrolipoltranssuccinase E2 Untereinheit)  
EC-Nr.: 2.3.1.61  
10 Referenz: Spencer et al.; European Journal of Biochemistry 141(2), 361-74 (1984)  
Accession No.: AE000175  
Alternative Gennamen: lys, met  
sucC-Gen:  
Bezeichnung: Succinyl-CoA Synthetase,  $\beta$ -Untereinheit  
EC-Nr. 6.2.1.5  
Referenz: Buck et al.; Biochemistry 24(22), 6245-52 (1985)  
Accession No.: AE000176  
sucD-Gen:  
Bezeichnung: Succinyl-CoA Synthetase,  $\alpha$ -Untereinheit  
EC-Nr. 6.2.1.5  
Referenz: Buck et al.; Biochemistry 24(22), 6245-52 (1985)  
Accession No.: AE000176  
aspA-Gen:  
25 Bezeichnung: Aspartat Ammonium-Lyase (Aspartase)  
EC-Nr.: 4.3.1.1  
Referenz: Takagi et al.; Nucleic Acids Research 13(6), 2063-74 (1985)  
Accession No.: AE000486  
30 gltA-Gen:  
Bezeichnung: Citratsynthase  
EC-Nr.: 4.1.3.7  
Referenz: Spencer und Guest, Journal of Bacteriology 151 (2), 542-52 (1982)  
Accession No.: AE000175  
Alternative Gennamen: gluT, icdB  
sdhB-Gen:  
Bezeichnung: Succinatdehydrogenase  
EC-Nr.: 1.3.99.1  
40 Referenz: Darlison und Guest, Biochemical Journal 223(2), 507-17 (1984)  
Accession No.: AE000175  
aceB-Gen:  
Bezeichnung: Malatsynthase A  
45 EC-Nr.: 4.1.3.2  
Referenz: Byrne et al.; Nucleic Acids Research 16(19), 9342 (1988)  
Accession No.: AE000474  
Alternativer Gennamen: mas  
50 aceK-Gen:  
Bezeichnung: Isocitratdehydrogenase Kinase/Phosphatase  
EC-Nr.: 2.7.1.116  
Referenz: Cortay et al.; Journal of Bacteriology 170(1), 89-97 (1988)  
55 Klumpp et al.; Journal of Bacteriology 170(6), 2763-9 (1988)  
Accession No.: AE000474  
[0018] Die Nukleinsäuresequenzen können den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) der National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), der Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge, UK) oder der DNA Datenbank von Japan (DDBJ, Mishima, Japan) entnommen werden.  
65 [0019] Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen Gene können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele der Gene verwendet werden, die sich aus

der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen ("sense mutations") ergeben. [0020] Zur Erzielung einer Abschwächung können beispielsweise die Expression der Gene oder die katalytischen Eigenschaften der Enzymproteine herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

[0021] Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung, durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression oder auch durch Antisense-RNA Technik erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191–195 (1998)), bei Carrier und Keasling (Biotechnology Progress 15, 58–64 (1999)), Franch und Gerdes (Current Opinion in Microbiology 3, 159–164 (2000)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Knippers ("Molekulare Genetik", 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

[0022] Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611–8617 (1997)), Yano et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95, 5511–5515 (1998)), Wente und Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266, 20833–20839 (1991)) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem von Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

[0023] Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen ("missense mutations") oder Nichtsinnmutationen ("nonsense mutations") gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen ("frame shift mutations"), die dazu führen, daß falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Entsteht als Folge der Mutation ein Stop-Kodon im Kodierbereich, so führt dies ebenfalls zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers ("Molekulare Genetik", 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

[0024] Geeignete Mutationen in den Genen wie beispielsweise Deletionsmutationen können durch Gen- bzw. Allelaustausch in geeignete Stämme eingebaut werden.

[0025] Eine gebräuchliche Methode ist die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 174, 4617–4622 (1989)) beschriebene Methode des Genaustauschs mit Hilfe eines konditional replizierenden pSC101-Derivates pMAK705. Andere im Stand der Technik beschriebene Methoden wie bei-

spielsweise die von Martinez-Morales et al. (Journal of Bacteriology 199, 7143–7148 (1999)) oder die von Boyd et al. (Journal of Bacteriology 182, 842–847 (2000)) können gleichfalls benutzt werden.

[0026] Es ist ebenfalls möglich, Mutationen in den jeweiligen Genen oder Mutationen, die die Expression der jeweiligen Gene betreffen, durch Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

[0027] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung eines oder mehrerer der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzym(e) des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat zu verstärken.

[0028] Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0029] Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

[0030] So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon (US-A-4,278,765),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen (DE-A-198 31 609),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231: 332 (1992)),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen (Gene 31: 279–283 (1984)),
- die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158: 647–653 (1986)),
- das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhIB (EP-A-0 994 190),
- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (DE 100 34 833.5),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhIC (EP-A-1 013 765),
- das für den Threoninexport kodierende thrE-Gen von Corynebacterium glutamicum (DE 100 26 494.8), und
- das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257–5266 (1983); Gene 23: 199–209 (1983))

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

**[0031]** Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Ravnikar und Somerville, *Journal of Bacteriology* 169, 4716-4721 (1987)),
- das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Vogel et al., *Archives in Microbiology* 149, 36-42 (1987)),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfp (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)),
- das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen (Medina et al. (*Journal of Bacteriology* 172, 7151-7156 (1990))),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen (Grabau und Cronan (*Nucleic Acids Research* 14 (13), 5449-5460 (1986))),
- das für das Enzym Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen (Matsuoka und McFadden, *Journal of Bacteriology* 170, 4528-4536 (1988)),
- das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen (Hosono et al., *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 59, 256-251 (1995)), das auch unter der Bezeichnung mlc-Gen bekannt ist, und
- das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen (Jahreis et al., *Molecular and General Genetics* 226, 332-336 (1991)), das auch unter der Bezeichnung cra-Gen bekannt ist,

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

**[0032]** Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: *Overproduction of Microbial Products*, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

**[0033]** Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im batch-Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch (Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (*Bioprozesstechnik 1. Ein-*

*führung in die Bioverfahrenstechnik* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (*Bioreaktoren und periphere Einrichtungen* (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

**[0034]** Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

**[0035]** Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

**[0036]** Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

**[0037]** Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefügt werden.

**[0038]** Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

**[0039]** Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninyhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (*Analytical Chemistry*, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (*Analytical Chemistry* (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

**[0040]** Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie beispielsweise L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, **dadurch gekennzeichnet**, daß man folgende Schritte durchführt:
  - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceR und aceK, oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet,
  - b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
  - c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (> 0 bis 100%) davon im Produkt verbleiben.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talE, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere ausschaltet.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die regulatorischen und/oder katalytischen Eigenschaften der Polypeptide (Proteine) verringert, für die die Polynukleotide malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, kodieren.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
  - 6.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon,
  - 6.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,
  - 6.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase ko-

- dierende pps-Gen,
  - 6.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen,
  - 6.5 die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB,
  - 6.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,
  - 6.7 das für die Malat: Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen,
  - 6.8 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC,
  - 6.9 das für den Threoninexport kodierende thrE-Gen, und
  - 6.10 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen
- verstärkt, insbesondere überexprimiert.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
  - 7.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,
  - 7.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-Gen,
  - 7.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfA,
  - 7.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,
  - 7.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen,
  - 7.6 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen,
  - 7.7 das für die Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen,
  - 7.8 das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen, und
  - 7.9 das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen,
 abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.



## First Hit

## End of Result Set

☐ [Generate Collection](#) [Print](#)

L4: Entry 1 of 1

File: EPAB

Feb 6, 2003

PUB-NO: DE010135051A1

DOCUMENT-IDENTIFIER: DE 10135051 A1

TITLE: Preparing L-amino acids, e.g., L-threonine, by fermenting microorganisms of Enterobacteriaceae family in which genes e.g. malE, phoA, phoB, phoR are attenuated, in particular eliminated, and isolating L-amino acid

PUBN-DATE: February 6, 2003

## INVENTOR-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

HERMANN, THOMAS

DE

## ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

DEGUSSA

DE

APPL-NO: DE10135051

APPL-DATE: July 18, 2001

PRIORITY-DATA: DE10135051A (July 18, 2001)

INT-CL (IPC): C12 P 13/04; C12 P 13/08

EUR-CL (EPC): C12N009/12; C12N009/16, C12N015/52 , C12P013/08

## ABSTRACT:

CHG DATE=20030702 STATUS=O>Preparing (M) L-amino acids, e.g. L-threonine comprising fermenting microorganisms of Enterobacteriaceae family in which one or more of genes malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC to phnG, phnJ to phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA to pstC, pstS, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA to sucD, gltA and sdhB, or the sequence coding for it, is attenuated, is new. (M) comprises fermenting microorganisms of the Enterobacteriaceae family which produce the desired L-amino acid and in which one or more of the genes malE (periplasmic binding protein for maltose transport), phoA (alkaline phosphatase), phoB (regulatory protein of the pho regulon), phoR (sensor protein of the pho regulon), phoE (pore protein E of the outer cell membrane), phnC (ATP-binding protein of the alkyl phosphonate transport system), phnD (substrate-binding protein of the alkyl phosphonate transport system), phnE (permease protein of the alkyl phosphonate transport system), phnF (putative regulatory protein), phnG, phnJ, phnM and phnP (membrane-bound subunit of the carbon-phosphorus lyase complex), phnK, phnL and phnN (ATP-binding proteins of the phosphonate transporter), phnO (putative regulator of the carbon-phosphorus lyase complex), pykF (fructose-stimulated pyruvate kinase I), pfkB (6-phosphofructokinase isoenzyme 2), eda (2-keto-3-deoxygluconate 6-phosphate aldolase and 2-keto-4-hydroxyglutamate aldolase (Entner-Doudoroff aldolase)), talB (transaldolase B), rpiB (ribose 5-phosphate isomerase B), zwf (glucose 6-phosphate 1-dehydrogenase), mopA (Chaperone GroEL, heat shock protein Hsp60), pstA (permease

protein of the high-affinity phosphate transport system), pstB (ATP binding component of the high-affinity phosphate transport system), pstC (permease protein of the high-affinity phosphonate transport system), pstS (periplasmic phosphate-binding protein of the high-affinity phosphate transport system), ugpA and ugpE (permease protein of the sn-glycerol 3-phosphate transport system), ugpC (ATP-binding component of the sn-glycerol 3-phosphate transport system), ugpQ (glycerol phosphodiester phosphodiesterase), dnaK (autoregulated heat shock protein Hsp70), dnaJ (Chaperone, heat shock protein), clpB (heat shock protein f84.1), rpoE (\=s-E subunit of RNA polymerase), rseA (membrane protein with anti-\=sE activity), rseC (regulatory protein of the \=sE factor), htpG (Chaperone, heat shock protein c62.5), sodA (superoxide dismutase), ompF (outer membrane protein F), ompC (outer membrane protein C), sucA (decarboxylase subunit of 2-ketoglutarate dehydrogenase), sucB (dihydrolipoyltranssuccinase subunit of 2-ketoglutarate dehydrogenase), sucC ( beta -subunit of succinyl-CoA synthetase), sucD ( alpha -subunit of succinyl-CoA synthetase), gltA (citrate synthase) and sdhB (iron-sulfur protein subunit of succinate dehydrogenase), or the nucleotide sequence which codes for this, is or are attenuated, in particular eliminated, concentrating the desired L-amino acid in the medium or in the cells of the microorganisms, and isolating the desired L-amino acid, constituents of the fermentation broth and/or the biomass in its entirety or its portions (greater than 0 to 100%) optionally remaining in the product.